

Title	ヒト血小板のCa <sup>2+</sup> 依存性中性蛋白分解酵素に対する内在性阻害蛋白質の精製と性質
Author(s)	芝, 英一
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34787">https://hdl.handle.net/11094/34787</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	しば 芝	えい 英	いち 一
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	6 6 7 6	号
学位授与の日付	昭和 59 年 12 月 27 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
学位論文題目	ヒト血小板の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性中性蛋白分解酵素に対する内在性阻害蛋白質の精製と性質		
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞		
	(副査) 教授 坂本 幸哉 教授 垂井清一郎		

## (目 的)

$\text{Ca}^{2+}$  依存性中性蛋白分解酵素 ( $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral protease : CANP) は,  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化され, 中性域にその至適 pH を有するチオールプロテアーゼである。CANP の生理的役割は未だ十分に解明されていないが, 内因性基質として筋蛋白質, ある種の酵素, 細胞構築蛋白が報告され, また骨格筋, 心筋, 赤血球より CANP に対する特異的阻害蛋白質 (CANP-INH) が精製されている。教室の左近,<sup>1)</sup> 辻仲<sup>2)</sup> は, 血小板の細胞質中に,  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の異なる二種の CANP, すなわち,  $\mu\text{M}$  レベルの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度で活性化される  $\mu$ -CANP と  $\text{mM}$  レベルの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度で活性化される  $\text{m}$ -CANP が存在すること, また血小板には内在性の CANP-INH が存在することを明らかにした。本研究はヒト血小板 CANP に対する CANP-INH の調節機構を明らかにするために, ヒト血小板より CANP-INH を精製し, その諸性質について検討を加えたものである。

## (方法ならびに成績)

## 1. CANP-INH 活性の測定

CANP-INH 活性は, 試料と一定量の CANP を  $25^{\circ}\text{C}$  で 10 分間インキュベートし, 0.5% 熱変性カゼインを基質として,  $2\text{ mM CaCl}_2$  存在下  $20^{\circ}\text{C}$ , pH 7.5 の条件で, 20 分間反応させ, トリクロル酢酸を含む停止液にて反応を止めた後, 遠心し, 上清のペプチドをフルオレスカミンを用いた蛍光法で測定した。既知の量の CANP の阻害活性より CANP-INH 活性を表現した。

## 2. CANP-INH の精製

ヒト洗浄血小板 ( $5.0 \times 10^{11}$ ) を破壊し,  $105.000 \times \text{g}$  の遠心上清を得た。CANP-INH がきわめて

耐熱性蛋白であることを利用し、80°C15分間の熱処理を加え、変性蛋白を遠心にて除去した。この上清の0-70%硫酸飽和沈澱分画を、DEAE-Sepharose CL-6B カラムにかけ、0-0.4 M NaClの直線塩濃度勾配で溶出した。NaCl濃度0.2 MでCANP-INH活性が溶出されたが、CANP活性は熱処理によって失活し、検出されなかった。CANP-INH活性を有する分画に2回目の熱処理(95°C, 15分間)を加え、変性蛋白を遠心にて除去後、上清を凍結乾燥し、緩衝液にて溶解した。これを透析し、Ultrogel AcA34にてゲル濾過を行なったところ、CANP-INH活性は、二つのピークに分離され、それぞれ分子量250 Kと60 Kに相当した。しかしSDS-PAGEにかけると、二つの分画はいずれも63 Kの単一バンドを示し、血小板CANP-INHは四量体および単量体として存在することが示唆された。

### 3. CANP-INHの諸性質

CANP-INHによるCANP活性阻害に対する $Ca^{2+}$ の影響を明らかにするため、一定量の精製された $\mu$ -CANP<sup>3)</sup>に種々の濃度の $Ca^{2+}$ 存在下でCANP-INHを加え、CANP活性の阻害を調べた。過剰の $Ca^{2+}$ を添加してもCANP-INHによる阻害は解消されず、また $\mu$ M濃度の $Ca^{2+}$ 存在下でも阻害が認められた。次いで精製CANP-INHが他のプロテアーゼに与える影響を検討したが、 $\alpha$ -キモトリプシン、プラスミン、パパイン、フィシンを阻害せず、CANPを特異的に阻害するものと考えられた。精製CANP-INHの精製 $\mu$ -CANPに対する阻害形式を、基質として0.0375%、0.075%の熱変性カゼインを用い、Dixon plotにて解析したところ、阻害形式は非競合的であり、 $K_i$ 値は $3.2 \times 10^{-8}$  Mであった。また部分精製したm-CAPに対してもmM濃度の $Ca^{2+}$ 存在下で阻害を示した。

#### (総括)

ヒト血小板よりCANP-INHを均一に精製した。CANP-INHは63 Kの単量体と63 K $\times$ 4の四量体で存在していることを示すデータがえられ、従来のCANP-INHの分子量に関する報告(ニワトリ骨格筋で68 K, ヒト赤血球とウシ心筋で250-400 K)の相異を説明することが可能となった。ヒト血小板CANP-INHはCANPに特異的で、 $\mu$ Mレベルの $Ca^{2+}$ 濃度でも $\mu$ -CANPを阻害した。したがってCANP-INHは細胞内でCANP活性を調節する役目をもつものと考えられる。またCANP-INHのCANPに対する阻害は $Ca^{2+}$ をキレートして阻害するものではなく、その阻害形式は、Dixon plotにより非競合的阻害を示し、 $K_i$ 値は $3.2 \times 10^{-8}$  Mであった。

#### 文献

- 1) M. Sakon, et al. *Experientia*, 38 : 1099, 1982.
- 2) T. Tujinaka, et al. *Thromb. Res.*, 28 : 149, 1982.
- 3) T. Tujinaka, et al. *Biochem. Int.*, 6 : 71, 1983.

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト血小板より初めて $Ca^{2+}$ 依存性中性蛋白分解酵素(CANP)に対する内在性阻害蛋白質(CANP-INH)を均一に精製し、その性質を調べたものである。その結果血小板CANP-INHは主とし

て tetramer として存在するが, monomer としても存在していること, CANP-INH の  $\mu$ -CANP に対する阻害は, 生理的細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度で働くことなどが明らかにされた。これらの知見は, CANP ならびに CANP-INH の生理作用を考えるうえで重要であり, 学位に価する。